

REPORT INTERMEDIO

TITOLO PROGETTO

“Valutazione di micro- e nano- particelle come possibili fattori causativi o prognostici nella sclerosi sistemica”.

INTRODUZIONE

La sclerosi sistemica (SSc) è una malattia sistemica caratterizzata da fibrosi della cute e degli organi interni a eziopatogenesi sconosciuta, multifattoriale e multistep. La presenza di subsets molto diversi dal punto di vista clinico-prognostico suggerisce il coinvolgimento di altri fattori oltre quelli genetici. L'associazione epidemiologica con fattori di rischio ambientali e occupazionali è stata frequentemente suggerita ma non ancora accertata [1].

Negli ultimi decenni, diversi studi hanno messo in evidenza l'importanza del particolato ambientale come cofattore nell'eziopatogenesi di numerose malattie cardiovascolari [2]. In virtù delle loro dimensioni, le particelle sottili e ultrasottili sono in grado di penetrare nel corpo umano per inalazione, ingestione e via dermica. E' già stato dimostrato come la presenza di micro- e nano- particelle a livello polmonare o cutaneo possa innescare il rilascio cronico di citochine e mediatori proinfiammatori responsabili del danno endoteliale vascolare e/o fibrotico [3,4]. Diversi studi tossicologici hanno dimostrato che le particelle sottili di dimensioni inferiori a 100 nanometri sono in grado di passare sia la barriera alveolare che la barriera cutanea e di raggiungere in pochi minuti il sistema circolatorio [5] dove si verifica un'interazione diretta con i componenti del sangue. Le particelle legano proteine sieriche formando un rivestimento chiamato protein-corona che ne altera le caratteristiche chimico/fisiche e le rende capaci di andare incontro a vari processi biologici, tra cui la traslocazione a livello di organi e tessuti (fegato, milza, cuore, midollo).

Un'esposizione cronica a micro- e nano- particelle causa biopersistenza in circolo permettendo così una costante presenza delle particelle nel siero ed un loro conseguente accumulo [6].

La presenza di micro e nanoparticelle nel siero e nei tessuti svolge inoltre un ruolo diretto nella modulazione del sistema immunitario. A seconda dell'idrofobicità di superficie e della carica, le particelle presenti nel siero possono interagire ed essere opsonizzate da proteine plasmatiche (per esempio albumina, apolipoproteina, immunoglobuline, complemento, fibrinogeno) inducendo il loro

riconoscimento e l'attivazione dai fagociti professionali [7]. Vari studi sono stati condotti e sono tutt'ora in corso sugli effetti delle nanoparticelle organiche ed inorganiche sul sistema immunitario. Tra i più recenti ricordiamo uno studio del 2011 in vivo sulle nanoparticelle di ossido di Titanio. Le nanoparticelle sono state in grado di attivare direttamente la risposta immunitaria innata sino alla risposta cellulo-mediata, provocando l'attivazione a lungo termine dei linfociti T CD4+ e CD8+ [8]. Ad ulteriore esempio dell'effetto immunomodulante delle nanoparticelle vi è un lavoro di Taccola et al., il quale riporta che nanoparticelle di ossido di Zinco sono risultate tossiche selettivamente in cellule immunitarie proliferanti [9]. Nel 2013 una review ha dimostrato come l'ossido di silicio sia un importante fattore di rischio nello sviluppo della vasculite sistemica ANCA associata. Recentemente, dal nostro gruppo di studio, è stata individuata in campioni di siero di pazienti crioglobulinemici, la presenza distintiva di particelle micro- e nano-dimensionate in grado di interagire selettivamente con immunocomplessi formati da IgG-IgM [10]. Essendo la sclerodermia una malattia cronica e progressiva di tipo autoimmune, i meccanismi iniziali della malattia legati all'autoimmunità potrebbero essere correlati ad una lenta ma persistente esposizione ad alcuni elementi sottoforma di particolato ultrafine. Il nostro studio è quindi teso a valutare il possibile ruolo di fattori ambientali nell'insorgere e nello sviluppo della SSc.

OBIETTIVI DELLO STUDIO

L'obiettivo primario del presente progetto è quello di determinare la presenza e di caratterizzare micro- e nano- particelle in matrici biologiche di pazienti e soggetti sani per individuare un pattern di tipo causativo correlato alla malattia. Lo studio si prefigge di valutare ogni possibile relazione tra parametri clinici e presenza di particelle contaminanti con eventuale individuazione di sottogruppi correlati ad elementi metallici definiti. L'analisi mediante microscopia elettronica ed il dosaggio dei principali elementi in traccia rappresenta un possibile esame predittivo nei soggetti predisposti alla malattia e potrebbe rivelarsi un efficace indice prognostico applicabile su larga scala.

Gli obiettivi secondari del presente studio consistono nel valutare l'eventuale affinità delle particelle maggiormente identificate verso immunoglobuline umane e nell'individuare un possibile ruolo diretto delle particelle nella formazione di autoanticorpi (anti-topoisomerasi I, anti-centromero).

MATERIALI E METODI

Selezione dei pazienti

Al momento sono stati valutati trenta pazienti affetti da SSc di età media pari a 55 anni (± 13 anni) in accordo con i criteri dell'American College of Rheumatology [11]. I pazienti afferiscono al reparto di Reumatologia del Policlinico di Modena e sono tutti residenti nella stessa area geografica (provincia di Modena). Come gruppo di controllo sono stati reclutati venti soggetti sani comparabili per età e sesso ai pazienti sclerodermici.

Scelta delle matrici biologiche

Partendo dall'obiettivo primario, si è operata una scelta per individuare le matrici biologiche più idonee su cui eseguire le analisi ultrastrutturali per rilevare le micro- e nano- particelle. Le tre principali matrici prese in considerazione sono state siero, capelli e biopsie. Si è scelto il siero come matrice biologica primaria poiché rappresenta il liquido biologico elettivo usato per la valutazione dell'esposizione ai metalli ed è usato sia per lo screening che per il bio-monitoraggio di contaminanti nel medio e nel lungo termine. La misura degli elementi in traccia nel siero, inoltre, è indicativa del livello dei metalli negli organi e nei tessuti bersaglio, fungendo da indicatore primario. I capelli al momento sono stati scartati poiché soggetti a contaminazione esterna (uso di shampoo, balsami, tinte). Le biopsie saranno valutate nella seconda parte dello studio.

Valutazione dell'esposizione

Per valutare l'esposizione ad particelle micro- e nano- dimensionate è stato appositamente elaborato un questionario anamnestico diretto ai pazienti ed ai controlli inclusi nello studio. Il questionario ha permesso di raccogliere informazioni cliniche e demografiche, e di ricostruire le abitudini e la storia occupazionale/residenziale di tutti i soggetti considerati nello studio.

Sono state identificate quattro principali fonti di esposizione: l'esposizione occupazionale, l'esposizione ambientale, l'abitudine al fumo e l'impianto di protesi.

Nella prima categoria rientrano tutti soggetti con una storia di impiego lavorativo in ceramica o nell'industria chimica, tessile e delle costruzioni, e regolarmente esposti a polveri, vapori o aerosol durante il lavoro quotidiano per un periodo di almeno 5 anni. La seconda categoria "esposizione ambientale" comprende tutti i soggetti esposti all'inquinamento atmosferico e a particelle sospese nell'aria. Vi rientra chi risiede a meno di 4 km di distanza da aeroporti, autostrade, inceneritori o altre fonti di polveri da combustione. La terza categoria considera fumatori i soggetti dediti all'abitudine al fumo per un periodo superiore o uguale a 5 anni. Si sono anche raccolte le informazioni in merito al numero medio di sigarette o sigari fumati al giorno e il numero di anni di fumo attivo. Studi

precedenti hanno dimostrato che le protesi articolari e odontoiatriche sono soggette ad usura e possono rilasciare detriti nei linfonodi, nel midollo osseo, nel fegato e nella milza. Tenendo conto di questi dati abbiamo considerato nella quarta categoria tutti i soggetti con impianti d'anca o femore, protesi dentali, impianti di pacemaker e stent coronarici.

Prelievo dei campioni biologici

Dopo aver effettuato l'intervista per il questionario anamnestico, sono stati raccolti 8mL di sangue da ciascun soggetto reclutato nello studio. Il campione è stato prelevato utilizzando provette di polistirene sterili sottovuoto precedentemente valutate, prive di agenti chimici e di contaminanti esterni (Vacutest Kima, Pd, Italy). Il campione di sangue è stato mantenuto a 37°C per 2 ore. In seguito la frazione sierica è stata ottenuta mediante centrifugazione di ogni campione a 3000 rpm per 10 minuti. Il siero è stato poi sottoposto ad analisi qualitativa e quantitativa per valutare rispettivamente la presenza di micro- e nano- particelle e dei principali elementi in traccia.

Analisi ultrastrutturale qualitativa dei campioni e microanalisi delle particelle

La caratterizzazione morfologica del particolato è stata effettuata mediante Microscopia Elettronica a Scansione Ambientale - Environmental Scanning Electron Microscopy - ESEM (strumento Quanta 200, Fei company, Holland), mentre l'identificazione chimica delle particelle è stata attuata mediante Spettroscopia a raggi X per Dispersione di Energia (EDS: Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy della Oxford Instruments, Manheim, Germany).

Sono stati prelevati da ogni provetta 100 µl di siero e messi in tubi eppendorf privi di contaminanti da 1 ml. In seguito sono stati effettuati 3 lavaggi in acqua ultrapura mediante centrifugazione 15 minuti a 3000 rpm. Una volta scartato il sovrantante, 5 µl di precipitato sono stati posti su un vetrino di acetato privo di qualsiasi impurità. I vetrini così ottenuti sono stati montati grazie ad un adesivo in carbonio su un supporto di alluminio ed analizzati all'ESEM a 25kV in condizioni di basso vuoto senza alcun ulteriore trattamento per non alterare la superficie del campione.

Per valutare il numero di zone positive del campione contenenti micro- e nano- particelle, è stato adottato il metodo di Fassina et al [12]. Le analisi condotte sul siero di tutti i soggetti reclutati nello studio hanno permesso di ottenere informazioni sulla dimensione, il formato, la distribuzione, il numero, la superficie e la composizione chimica delle micro- e nano- particelle presenti. I risultati derivati da queste analisi sono stati elaborati statisticamente mediante il programma Image-Pro Plus per ottenere una stima semiquantitativa del particolato nei campioni sierici.

Analisi strumentale quantitativa degli elementi in traccia presenti nei campioni

La valutazione totale quantitativa degli elementi in traccia presenti nel siero è stata svolta attraverso Spettrometria di Massa al Plasma ad Emissione Atomica (ICP-AES) (Thermo iCAP 6000, Fisher Scientific, USA) basandosi sui protocolli approvati dall'Istituto Superiore di Sanità [13].

Sono stati misurati i principali elementi: Al, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Si, Ti, Zn. L'ottimizzazione dell'ICP-AES è stata svolta utilizzando le lunghezze d'onda specificate dall'Istituto Superiore di Sanità ed i relativi limiti di rilevabilità per ciascun elemento. Le lunghezze d'onda sono state selezionate per ogni elemento in modo tale da evitare l'interferenza degli altri elementi e sono riportate nella tabella 1. I campioni di siero sono stati diluiti 1:5 con acqua deionizzata a basso contenuto di silicio (EASY-pure, PBI, Milano, Italia) ed in seguito sono stati sottoposti a un processo di digestione utilizzando acido nitrico all'1% (Carlo Erba, Milano, Italia) per solubilizzare la parte organica. I risultati ottenuti dall'analisi quantitativa sono stati confrontati con i dati ottenuti mediante microscopia elettronica per valutare le differenze ed il ruolo delle particelle micro- e nano- dimensionate rispetto alla componente in traccia presente nel siero.

Elementi	Lunghezza d'onda (nm)	Limiti di rilevazione ($\mu\text{g/mL}$)
Al	396.152	0.002
Cr	267.7	0.002
Cu	224.7	0.002
Fe	259.94	0.005
Mg	279.806	0.001
Mn	260.5	0.001
Si	251.611	0.08
Ti	336.1	0.002
Zn	213.856	0.002

Tabella 1. Lunghezze d'onda e limiti di rilevazione utilizzati per le analisi di ICP-AES.

Analisi statistica dei dati

L'elaborazione dei dati è stata effettuata utilizzando il software statistico GraphPad Prism 5.5 (GraphPad Software Inc., UK) per Windows. Per le variabili qualitative è stata calcolata la distribuzione di frequenza utilizzando il software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, USA). Le variabili quantitative sono riportate in termini di media e deviazioni standard ed analizzate mediante l'analisi di varianza (ANOVA). Per confronto tra variabili quantitative è stato utilizzato il test di Mann-Whitney.

RISULTATI

Valutazione del rischio da esposizione a micro- e nano- particolato

La tabella 2 mostra i risultati relativi al rischio di esposizione di trenta casi di sclerodermia e di venti controlli in base ai dati raccolti dal questionario anamnestico. Sono state considerate le quattro principali categorie di esposizione e per ciascuna di essa sono riportati gli odds ratio e gli intervalli di confidenza al 95%. Un significativo aumento del rischio di SSc è stato associato con l'esposizione occupazionale (OR = 6.00 ; CI = 1.607 - 22.40). I dati sull'esposizione ambientale (OR = 1.351; CI = 0.4024 - 4.535), sull'abitudine al fumo (OR = 1.500 ; CI = 0.4232 - 5.317) e sulla presenza di impianti o protesi (OR = 3.000; CI = 0.2985 - 3.988) non sono risultati significativi.

Questo studio ha analizzato pazienti con SSc appartenenti alla provincia di Modena. Tutti i diciotto pazienti inseriti nella categoria "esposizione occupazionale" hanno lavorato per oltre 5 anni in industrie locali. Cinque di questi pazienti hanno lavorato nel settore ceramico, altri cinque hanno lavorato nel settore manifatturiero tessile, tre nel settore metalmeccanico, tre in colorifici ed altri due in imprese edili. I pazienti con SSc della categoria esposizione ambientale sono stati esposti principalmente all'inquinamento da traffico urbano (SMOG and DEP).

Categorie di esposizione	SSc pazienti (30)		Controlli (20)		OR*	95% CI
	n	%	n	%		
Esposizione occupazionale	18/30	60	4/20	8	6.00	1.607 to 22.40
Esposizione ambientale	11/30	37	6/20	12	1.351	0.4024 to 4.535
Abitudine al fumo	10/30	33	5/20	10	1.500	0.4232 to 5.317
Impianti e protesi	8/30	26	5/20	2	1.091	0.2985 to 3.988

Tabella 2: Categorie di esposizione a micro- e nano- particelle e calcolo del rischio di insorgenza di SSc.

Analisi qualitativa di micro e nano particelle nei campioni sierici

Le analisi ESEM sono state effettuate su campioni di siero di trenta pazienti SSc e di venti controlli per individuare e caratterizzare le micro- nano- particelle presenti. Ogni zona (400x) contenente particolato si definisce positiva ed è stata suddivisa in regioni definite spot (800x). Ogni spot positivo è stato scansionato ad alto ingrandimento (10000x fino a 40000x) per determinare il diametro medio delle particelle. Un esempio dell'analisi ultrastrutturale condotta sul siero di uno dei pazienti sclerodermici è riportato nella figura 1 che mostra la morfologia del campione e delle particelle a diversi ingrandimenti. Nei campioni dei pazienti SSc sono state identificate sia micro- che nano- particelle: il diametro eterogeneo delle particelle rilevate è

compreso tra 50 nm e 3,7 micrometri. Le particelle sono presenti sia in singola forma che in forma di aggregati e di agglomerati micrometrici. Il numero di spot (NS) positivi contenenti micro- e nano- particelle rilevato mediante analisi ESEM è risultato statisticamente significativo nei pazienti con SSc rispetto ai controlli ($p < 0.0001$) indicando una gran quantità di polveri presenti nel siero dei pazienti.

La composizione delle polveri sottili riscontrate nei campioni sierici dei pazienti (Figura 3), ottenuta mediante microanalisi EDS, è risultata complessa ed eterogenea. Gli elementi ritrovati con maggior frequenza sono il Si, Fe, Zn, Al, Ti e Mg mentre è stata trovata una minore frequenza di occorrenza per quanto riguarda il Cu, Mn, Ni, Cr, Ba, Zr e Sn. Il silicio risulta presente nel 89% delle particelle identificate ed è l'unico elemento presente in tutti i campioni sierici fin'ora esaminati relativi ai primi trenta pazienti reclutati in studio. Fe ed Al sono presenti rispettivamente nel 30% e nel 26% delle particelle analizzate e risultano spesso associate al Si. Il Mg risulta presente nel 10% delle particelle rilevate e si trova spesso associato a complessi multi elementari. Il Ti è in meno dell'1% delle particelle individuate e risulta nel 99% dei casi associato al Si.

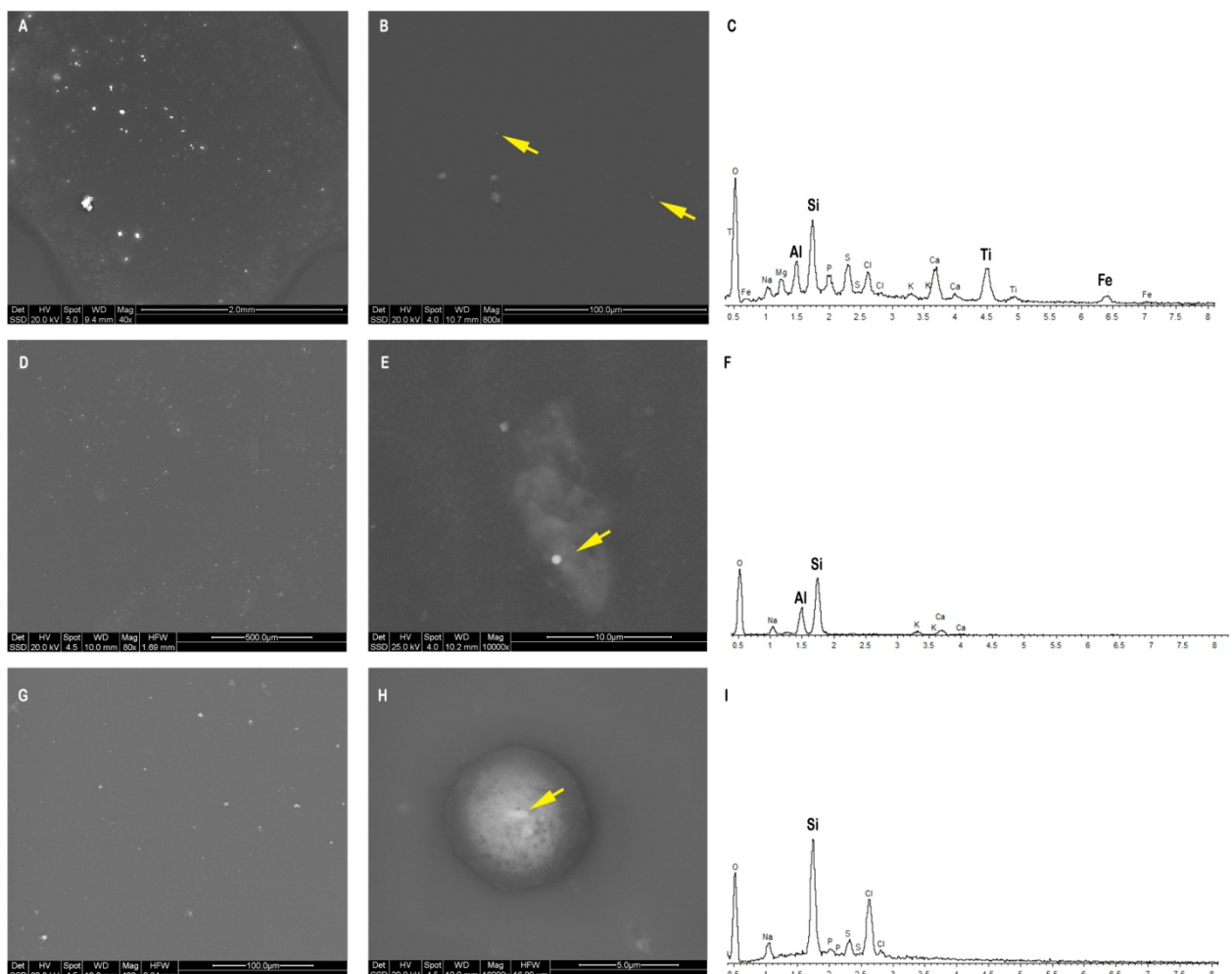


Figura 1: Analisi ESEM del siero di un paziente con SSc. Ogni colonna corrisponde al tipo di ingrandimento (A,D,G: basso ingrandimento; B,E,H: alto ingrandimento). L'immagine H mostra una microparticella di sforma sferica contenente una nanoparticella di Si: è un tipico esempio della morfologia delle particelle derivate da processi di combustione. Sulla destra delle immagini ESEM sono riportati gli spettri EDS delle particelle indicate con la freccia. Lo spettro di emissione, esito della microanalisi, mostra sull'asse delle ascisse il livello di energia dei raggi X caratteristico di ogni elemento, mentre sull'asse delle ordinate il numero di conteggi, ovvero di raggi X giunti allo spettrometro per ogni livello di energia.

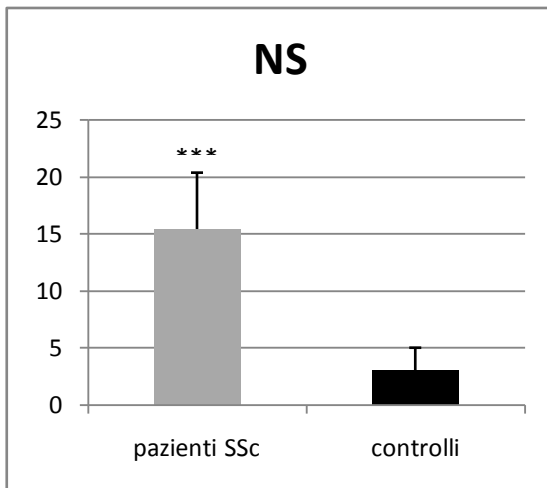


Figura 2: Numero di spot (media e SD) positivi per la presenza di particelle nei pazienti con SSc e nei controlli.

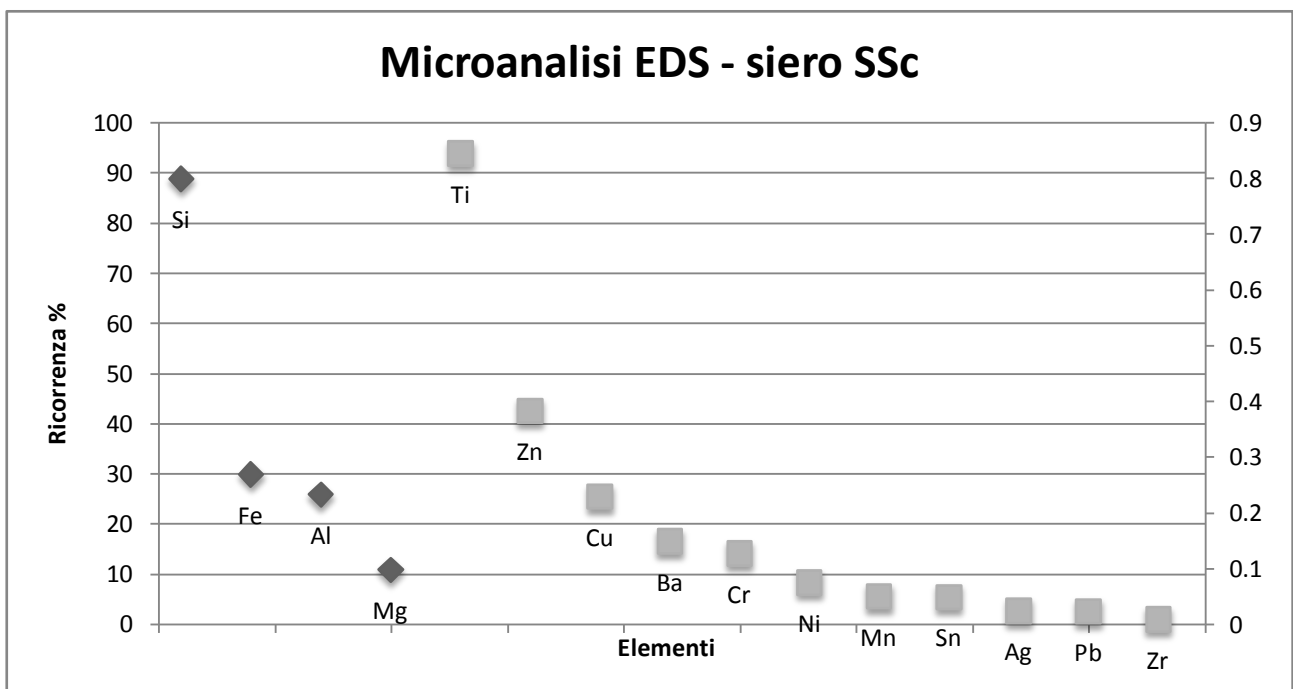


Figura 3: Ricorrenza degli elementi chimici rilevati dall'analisi EDS delle particelle rilevate mediante ESEM nei campioni sierici dei pazienti SSc.

Analisi quantitativa dei principali elementi in traccia presenti nei campioni sierici

La concentrazione degli elementi in traccia ($\mu\text{gr/ml}$ o ppb) nel siero dei trenta pazienti analizzati e in quello dei venti soggetti appartenenti al gruppo di controllo è riportata nella Tabella 3. L'analisi comparativa degli oligoelementi tra il gruppo di controllo ed i campioni di siero dei pazienti SSc rivela le seguenti tendenze: nei pazienti SSc vi è un aumento significativo di Al, Cr, Si, Ti ($p < 0.0001$) e Zn ($p < 0.01$), mentre si rileva una diminuzione significativa del Fe rispetto ai controlli ($p < 0.01$).

La concentrazione totale elementare del Ti (450%) e del Cr (312%) risulta estremamente elevata rispetto al gruppo di controllo. La quantità media rilevata del Ti nei campioni sierici dei malati è di 10.27 ± 3.77 ppb contro 1.86 ± 1.56 ppb del gruppo di controllo. La quantità media del Cr è pari a 9.08 ± 1.97 ppb contro 2.20 ± 0.34 ppb del gruppo di controllo.

Al e Si sono elementi presenti in quantità maggiore nel siero sia dei controlli e che dei pazienti SSc, e risultano aumentati rispettivamente del 171% e del 215% nei malati. E' stata rilevata una concentrazione di 95.09 ± 12 ppb di Al e di 400 ± 18 ppb di Si nel siero dei pazienti, mostrando nel caso del Si una più elevata concentrazione elementare rispetto ai valori di riferimento dei controlli (132 ppb). Il Fe è risultato essere l'unico elemento significativamente diminuito rispetto ai controlli (-35%) con un valore medio di 1079 ± 442 ppb nel siero dei pazienti SSc contro il valore di 1658 ± 168 ppb dei soggetti sani.

Non sono state rilevate nello studio variazioni significative della concentrazione degli elementi in traccia tra maschi e femmine a causa del rapporto sbilanciato a favore delle femmine. L'ampliamento della casistica permetterà di ottenere informazioni statisticamente più robuste.

Elementi	Controlli (N=20)	Pazienti con SSc (N=30)	
	ppb	ppb	% elemento
Al	35.65 ± 2.77	$95.09 \pm 12^{***}$	171%
Cr	2.20 ± 0.34	$9.08 \pm 1.97^{***}$	312%
Cu	958 ± 229	1059 ± 240	10%
Fe	1658 ± 168	$1079 \pm 442^*$	-35%
Mg	23092 ± 1427	20359 ± 2984	-12%
Mn	0.6 ± 0.20	1.07 ± 0.9	78%
Si	127 ± 22	$400 \pm 18^{***}$	215%
Ti	1.86 ± 1.56	$10.27 \pm 3.77^{***}$	450%
Zn	985 ± 99	$1399 \pm 478^*$	42%

Tabella 3: risultati medi della determinazione degli elementi in traccia nei campioni sierici.

Legenda della significatività statistica p-value: $***p < 0.0001$ altamente significativo; $**p < 0.001$ significativo; $*p < 0.01$ poco significativo.

DISCUSSIONE SUI PRIMI RISULTATI PRELIMINARI

I risultati del nostro studio evidenziano: a) la presenza ricorrente di Si sia in forma particellare che come elemento in traccia in tutti i campioni sierici dei pazienti sclerodermici, b) il 60% dei soggetti sclerodermici risultano esposti in ambito occupazionale a micro e nano polveri; c) un significativo aumento degli elementi in traccia Zn, Al, Ti e Mg nei campioni sierici dei pazienti sclerodermici.

I risultati preliminari dello studio dimostrano una corrispondenza tra i dati raccolti mediante il questionario anamnestico ed i risultati ottenuti mediante le metodiche analitiche applicate (ESEM-EDS, ICP-AES). La presenza significativa del Si sia in forma particellare che come elemento in traccia in tutti i campioni sierici dei pazienti SSc sembrerebbe confermare il sospetto di un ruolo diretto di tale elemento nell'eziopatogenesi della SSc. La sclerodermia è stata associata già in passato ad esposizione cronica alla silice [1] ma non è stato ancora descritto un effetto di dose dipendenza. In aggiunta, sebbene si sia riscontrata una frequente positività agli anticorpi anti topoisomerasi I nei pazienti esposti alla silice [14], non vi è alcun studio immunologico che confermi il ruolo ed il meccanismo d'azione coinvolto nella formazione di tali autoanticorpi.

L'analisi quantitativa utilizzata nello studio individua un aumento del 215% di Si in traccia nel siero dei pazienti con SSc rispetto ai controlli. Questi dati preliminari mostrano per la prima volta un valore medio quantitativo sierico (400 ± 18 ppb) di Si nei soggetti sclerodermici rispetto ai valori di soggetti sani (127 ± 22 ppb) comparabili per sesso, per età ed estrazione geografica.

Le analisi ESEM confermano la rilevante presenza di micro- e nano- particelle di Si nel siero dei pazienti SSc, rivelando la natura complessa e spesso multi elementare di tali particelle. La presenza di Al insieme al Si risulta direttamente correlata ai pazienti che hanno lavorato in ceramica o che risiedono in linea vicino al comprensorio ceramico modenese (<2km). Cu e Cr si riscontrano principalmente nei campioni sierici dei pazienti che hanno fumato regolarmente, mentre Ti e Fe ricorrono più frequentemente nei pazienti che hanno lavorato nell'industria metal meccanica.

Diciotto pazienti su trenta hanno un impiego nell'industria tessile, ceramica, metal meccanica o in serigrafie, a conferma del pattern degli elementi riscontrati mediante analisi ESEM e ICP-AES. Undici pazienti su trenta sono esposti ad alte concentrazioni ambientali di polveri derivate dal traffico o da inquinamento industriale. La frazione particellare nel siero dei pazienti è indice di un'esposizione occupazionale ed ambientale a polveri sottili ed ultra sottili derivate da processi industriali ed in particolare a silice libera cristallina.

Stiamo includendo nella valutazione un numero maggiore di pazienti affetti da SSc in modo da poter effettuare correlazioni cliniche statisticamente significative, da poter valutare la "dose dipendenza" e trovare possibili nuovi meccanismi patogenetici.

SECONDA FASE DEL PROGETTO

1. Si continuerà il reclutamento dei soggetti fino al raggiungimento di 50 pazienti e 50 controlli;
2. Si sottoporrà il questionario anamnestico ai nuovi soggetti reclutati;
3. Si analizzeranno mediante ESEM-EDS e ICP-AES i sieri dei nuovi soggetti reclutati e le biopsie cutanee presenti nell'archivio del Dipartimento di Anatomia Patologica del Policlinico Modena;
4. Si valuteranno statisticamente i risultati ottenuti scontrandoli con la diagnosi clinica dei pazienti ed i dati di esposizione a micro e nano particolato;
5. Si analizzerà mediante SDS-PAGE e mediante MALDI-TOF l'interazione tra proteine sieriche e le nanopolveri di Si, Fe, Ti, Zn ed Al. Verrà studiata l'eventuale comparsa ed interazione diretta tra nanoparticelle ed anticorpi anti nucleari ed anti centromero;
6. Si definiranno parametri dose dipendenti in base ai dati ottenuti dai sieri dei pazienti per individuare sottogruppi a rischio o identificare efficaci parametri prognostici.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Julio Sanchez-Roman, Ingeborg Wichmann, Javier Salaberri, Jose M Varela, Antonio Nufnez-Roldan: **“Multiple clinical and biological autoimmune manifestations in 50 workers after occupational exposure to silica”** Annals of the Rheumatic Diseases 1993; 52: 534-538
2. Le Tertre A, Medina S, Samoli E, Forsberg B, Michelozzi P, Boumghar A, Vonk JM, Bellini A, Atkinson R, Ayres JG, Sunyer J, Schwartz J, Katsouyanni K: **Short-term effects of particulate air pollution on cardiovascular diseases in eight European cities.** *J Epidemiol Community Health.* 56(10):773-9 (2002)
3. Kennedy IM, Wilson D, Barakat AI: **Uptake and inflammatory effects of nanoparticles in a human vascular endothelial cell line.** *Res Rep Health Eff Inst.* (136):3-32. (2009) - HEI Health Review Committee
4. Gojova A1, Guo B, Kota RS, Rutledge JC, Kennedy IM, Barakat AI: **Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition.** *Environ Health Perspect.* 115(3):403-9. (2007)
5. A. Nemmar, P.H. Hoet, B. Vanquickenborne, D. Dinsdale, M. Thomeer, M.F. Hoylaerts, H. Vanbilloen, L. Mortelmans, B. Nemery: **Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans.** *Circulation.* 105(4):411-4. (2002)
6. Saptarshi SR, Duschl A, Lopata AL: **Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle.** *J Nanobiotechnology.* 19;11:26 (2013) – REVIEW

7. Buzea C1, Pacheco II, Robbie K: **Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity.** *Biointerphases.* 2(4):MR17-71 (2007)
8. Gustafsson Å, Lindstedt E, Elfsmark LS, Bucht A: **Lung exposure of titanium dioxide nanoparticles induces innate immune activation and long-lasting lymphocyte response in the Dark Agouti rat.** *J Immunotoxicol.* 8(2):111-21 (2011)
9. Taccola L, Raffa V, Riggio C, Vittorio O, Iorio MC, Vanacore R, Pietrabissa A, Cuschieri A: **Zinc oxide nanoparticles as selective killers of proliferating cells.** *Int J Nanomedicine.* 6:1129-40 (2011)
10. Artoni E, Sighinolfi GL, Gatti AM, Capitani F, Campioli D, Magistroni R, Sebastani M, Ferri C: **“Presence and possible pathogenic role of micro e nano particles in mixed cryoglobulinemia” – XVIII National Congress ALCRI/GISC** (2011)
11. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, Matucci-Cerinic M, Naden RP, Medsger TA Jr, Carreira PE, Riemekasten G, Clements PJ, Denton CP, Distler O, Allanore Y, Furst DE, Gabrielli A, Mayes MD, van Laar JM, Seibold JR, Czirjak L, Steen VD, Inanc M, Kowal-Bielecka O, Müller-Ladner U, Valentini G, Veale DJ, Vonk MC, Walker UA, Chung L, Collier DH, Ellen Csuka M, Fessler BJ, Guiducci S, Herrick A, Hsu VM, Jimenez S, Kahaleh B, Merkel PA, Sierakowski S, Silver RM, Simms RW, Varga J, Pope JE: **“2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative”** *Ann Rheum* 72(11):1747-55 (2013)
12. Fassina A, Corradin M, Murer B, Furlan C, Guolo A, Ventura L, Montisci M: **“Detection of silica particles in lung tissue by environmental scanning electron microscopy”** *Inhal Toxicol.* 21(2):133-40 (2009)
13. Alimonti A, Bocca B, Mattei D, Pino A: **“Biomonitoraggio della popolazione italiana per l'esposizione ai metalli: valori di riferimento 1990-2009”** *Rapporti Istisan* 10/22, (2010)
14. Neil John Mchugh, Jean Whyte, Georgina Harvey, And Uwe F. Haustein: **“Anti-Topoisomerase I Antibodies In Silica-Associated Systemic Sclerosis”** *Arthritis & Rheumatism* Volume 37 Number 8, August 1994, Pp 1198-1205

Legenda degli elementi chimici

Si: silicio, Al: alluminio, Fe: ferro, Ti: titanio, Zn: zinco, Ni: nichel, Cu: rame, Cr: cromo, Mn: manganese, Ba: bario, Zr: zirconio, Ag: argento, Mg: magnesio, Sb: antimonio, Sn: stagno.

